



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 270 827**

⑤① Int. Cl.:
C12N 15/57 (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C07K 14/62 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **00926751 .9**
⑧⑥ Fecha de presentación : **23.03.2000**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1169461**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2002**

⑤④ Título: **Uso de procarboxipeptidasa B pancreática para la producción de insulina.**

③⑩ Prioridad: **09.04.1999 DE 199 15 938**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

⑦③ Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE

⑦② Inventor/es: **Habermann, Paul**

⑦④ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 270 827 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de procarboxipeptidasa B pancreática para la producción de insulina.

5 Las carboxipeptidasas son un grupo de enzimas con contenido en cinc, separadoras de proteínas o, respectivamente, de péptidos (proteasas), por las cuales los aminoácidos individuales son separadas hidrolíticamente, paso a paso, del carboxi terminal de las proteínas o, respectivamente péptidos, a degradar. Por lo tanto, las carboxipeptidasas pertenecen a las exopeptidasas. Las carboxipeptidasas de origen animal se forman en el páncreas como etapas previas (procarboxipeptidasas) y a través de la tripsina se transforman en el intestino en las formas activas, en donde son de gran importancia para la digestión de los péptidos, los productos de separación primarios de las proteínas. Según la especificidad del sustrato se hace distinción entre diferentes carboxipeptidasas.

15 La carboxipeptidasa B libera, por ejemplo, exclusivamente aminoácidos de carácter básico tales como arginina, lisina y ornitina. Las carboxipeptidasas son coadyuvantes para la determinación de las secuencias de péptidos y proteínas, puesto que con su ayuda se pueden identificar los aminoácidos situados en los extremos carboxi. Además, empleando carboxipeptidasa B se pueden confeccionar proteínas a la carta.

20 Un ejemplo técnico para el empleo de carboxipeptidasa B es la preparación del importante producto farmacéutico insulina. La preparación de esta hormona peptídica está descrita, entre otros documentos, en la solicitud de patente europea EP-A 0 489 780. En este caso, la carboxipeptidasa B se emplea en una importante etapa de la transformación en insulinas de estructuras de proinsulina abiertas con tripsina.

25 La carboxipeptidasa B, que se emplea en estos procedimientos técnicos, procede por lo regular de los preparados de carboxipeptidasa B que se pueden adquirir comercialmente. Éstos se obtienen preferentemente de páncreas de cerdo (Folk, J.E., Meth. Enzym.: 19, 504, 1970).

30 Sin embargo, las enzimas de origen animal tienen la desventaja de que pueden estar afectadas con el riesgo de la contaminación con virus de origen animal. La determinación de la exención de virus es compleja y entra como un factor esencial en el cálculo de los costes de producción. Si se utiliza la enzima en procedimientos a gran escala técnica, como la de la producción industrial de insulina, una desventaja más en los elevados costes logísticos se encuentra en la obtención y conservación de páncreas congelados.

35 Como alternativas a la preparación de carboxipeptidasa B a través de la extracción de tejido pancreático se ofrece la obtención biotecnológica. En este caso, existen muchas vías de preparación conocidas, tales como la expresión intracelular directa o la expresión en bacterias a través de una proteína de fusión, por ejemplo en forma de una proteína de fusión β -galactosidasa-carboxipeptidasa B (J. Biol. Chem., 267:2575-2581, 1992) o la correspondiente expresión en levaduras. Otra alternativa para ello es la expresión de un precursor de la carboxipeptidasa B, la procarboxipeptidasa B, la cual está constituida por la secuencia de los aminoácidos de la carboxipeptidasa B además de una secuencia señal, que conduce a la secreción del producto de expresión. Se han descrito sistemas de expresión adecuados para *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *E.coli* y las levaduras *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula polymorphus* y *Pichia pastoris* y se pueden adquirir, en parte, comercialmente.

45 Condición previa para la aplicación de sistemas de expresión para la preparación de carboxidasa B es que la cepa hospedante elegida en cada caso no se vea inhibida en su crecimiento por la presencia de carboxipeptidasa B activa, de manera que únicamente entonces sea posible una expresión. Las cepas hospedantes que presentan esta propiedad son generalmente difíciles de fermentar, de manera que se produce un peor rendimiento en cuanto a espacio y tiempo.

50 Un problema en el caso de la expresión intracelular de carboxipeptidasa B (expresión directa o como proteína de fusión) se encuentra en que la proteína primeramente no se presenta en la verdadera estructura espacial y, por lo tanto, es inactiva. Tiene que ser plegada después *in vitro* durante la purificación y procesamiento. En este caso, se puede llegar a plegamientos defectuosos, los cuales repercuten negativamente sobre la actividad y especificidad de la enzima y dificultan su empleo en la preparación de medicamentos.

55 También la preparación de carboxipeptidasa B por secreción de la forma madura, activa de la enzima presenta desventajas. Durante la fermentación, la carboxipeptidasa B se inactiva continuamente por la reacción con fragmentos de tipo peptídico de los componentes celulares o de los componentes del medio nutriente, los cuales son reconocidos como sustrato, de manera que se producen pérdidas de rendimiento.

60 En la solicitud de patente internacional con número de publicación WO95/14096 se dan a conocer secuencias de ADN, las cuales codifican carboxipeptidasa de cerdo. De Hochuli *et al.* (Bio/Technology, Nature Publishing Co., New York, noviembre 1988, páginas 1321-1325) describió una nueva tanda genética, para emprender la purificación de proteínas recombinantes mediante absorbentes a base de quelatos metálicos.

65 Una salida de este dilema es la expresión y secreción de una forma inactiva de carboxipeptidasa B en forma estéricamente correcta. Por reacción con una enzima se puede preparar a partir de este precursor, *in vitro*, la carboxipeptidasa B activa. "Carboxipeptidasa B activa" significa en este caso una carboxipeptidasa B, que se encuentra en la naturaleza; por ejemplo una carboxipeptidasa B del ser humano o formas isomorfas de ella que se presentan de forma natural.

“Carboxipeptidasa B activa” puede significar igualmente una muteína de la carboxipeptidasa B que se presenta de forma natural, en la cual tienen lugar eliminaciones, adiciones o sustituciones de la secuencia de aminoácidos, pero donde la actividad enzimática de la muteína corresponde cualitativamente a la actividad enzimática de la carboxipeptidasa B que se presenta de forma natural. El precursor citado puede ser la procarboxipeptidasa B natural o un derivado suyo, por ejemplo una isoforma o una muteína o carboxipeptidasa B que fue inactivada por adición de una secuencia peptídica. La clase de secuencia de la proteína añadida se describirá a continuación con más detalle. Es preferida una procarboxipeptidasa B o un derivado suyo, puesto que a partir de esta proteína se puede preparar de manera sorprendentemente bien controlable la carboxipeptidasa B activa. Además, la procarboxipeptidasa B y los derivados suyos citados se pueden almacenar durante largos espacios de tiempo, mientras que en el caso del almacenamiento de la carboxipeptidasa B se observa una pérdida de actividad.

Los citados derivados de la procarboxipeptidasa B contienen la secuencia de aminoácidos de la carboxipeptidasa B junto con la anexión de un péptido en posición N-terminal con la secuencia de aminoácidos de un péptido señal para la evacuación del derivado procedente del organismo hospedante utilizado para la expresión, eventualmente una secuencia de aminoácidos arbitraria con una longitud de hasta 100 aminoácidos y una secuencia de reconocimiento de endopeptidasa, la cual hace posible la separación enzimática del péptido anexionado adicionalmente en posición N-terminal, de la parte de carboxipeptidasa B del derivado. Ejemplos de tales secuencias de reconocimiento de endopeptidasas son las correspondientes secuencias de reconocimiento conocidas de tripsina, factor Xa, elastasa, quimotripsina y colagenasa.

De forma sorprendente se encontró, que la procarboxipeptidasa B se podía hacer reaccionar con proinsulina y tripsina en una reacción de un solo recipiente, de manera que la carboxipeptidasa B activa, recién formada, reconoce e hidroliza inmediatamente las argininas carboxiterminales de la cadena de insulina B, que se forman. La carboxipeptidasa B que se origina durante el proceso es más activa que la carboxipeptidasa B, que fue almacenada con anterioridad y que se añadió después para la reacción con proinsulina. La tripsina existente en la mezcla de reacción no sólo sirve para la activación de la procarboxipeptidasa B, sino que también corta específicamente la proinsulina y contribuye por tanto a la liberación de insulina madura.

Sorprendentemente, la cinética de la activación por tripsina no se perjudica por la adición de una secuencia tetra-His en el N-terminal de la procarboxipeptidasa B o de los derivados citados. La ventaja de una adición de este tipo radica en que la proteína se puede purificar así fácilmente por cromatografía de afinidad mediante la formación de un complejo con un quelato de níquel. La utilización de este tipo de procarboxipeptidasa B modificada es igualmente objeto de la invención.

Como ejemplo de la invención se expresa la secuencia cADN de la procarboxipeptidasa B pancreática humana. Sin embargo, está claro que en virtud de la gran homología de las secuencias, tanto a nivel de ADN como también a nivel proteico entre la enzima humana y las correspondientes enzimas, por ejemplo de la res vacuna, rata, cerdo u otras especies que forman tejido pancreático, se podría utilizar igualmente la secuencia de ADN de tales especies en lugar de la secuencia del ADN humano. También se puede utilizar la correspondiente secuencia de ADN que codifica muteínas de la carboxipeptidasa B. Igualmente se pueden utilizar secuencias de ADN que codifican isoformas naturales o creadas artificialmente de la carboxipeptidasa B o de la procarboxipeptidasa B. Además, naturalmente, se pueden utilizar todas aquellas secuencias de ADN que no se dan de forma natural, las cuales, debido a la capacidad de degeneración del código genético, pueden reemplazar las secuencias de ADN anteriormente citadas codificando una carboxipeptidasa B o una procarboxipeptidasa B o, respectivamente, una muteína de ellas.

Igualmente como ejemplo, el sistema de expresión de la *Pichia pastoris*, que se puede adquirir comercialmente de la razón social Invitrogen, se puede utilizar para la secreción de proteínas heterólogas para la preparación de la procarboxipeptidasa B humana. Para el experto en la materia está claro que también se pueden utilizar sistemas bacterianos, por ejemplo mutantes secretores de *E. coli*, como se han descrito en la solicitud de patente europea EP-A-0 448 093, si la secuencia de hirudina allí descrita se reemplaza por la secuencia de la procarboxipeptidasa. Otra alternativa sería la expresión de la procarboxipeptidasa B humana en estreptomicetos, tal como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente europea EP-A 0 504 798 para el caso de la expresión de glutarilamidasa.

Igualmente está claro, que en el caso de la utilización del procedimiento a escala industrial para el aislamiento de cantidades mayores de enzima se pueden encontrar otras etapas de purificación técnica de proteínas además de las descritas en los ejemplos, como las que se encuentran en el estado actual de la técnica.

Por consiguiente, la invención requiere un procedimiento para la preparación de carboxipeptidasa B pancreática o de una isoforma o de una muteína de la carboxipeptidasa B, según el cual

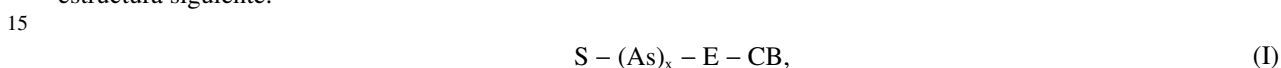
- (a) en un microorganismo se expresa de manera secretora una forma precursora natural o no natural de carboxipeptidasa B o una isoforma o una muteína de la carboxipeptidasa B,
- (b) la forma precursora expresada de manera secretora se purifica, y
- (c) la forma precursora purificada se transforma por un tratamiento enzimático en la carboxipeptidasa B activa o en una isoforma o una muteína de la carboxipeptidasa B;

ES 2 270 827 T3

especialmente un procedimiento de este tipo en el cual la carboxipeptidasa B pancreática o una isoforma de ella procede del ser humano, preferentemente un procedimiento de este tipo en el cual la forma natural del precursor corresponde a la procarboxipeptidasa B o a una isoforma suya.

5 En lo sucesivo, en el caso de hacer referencia al procedimiento descrito se utilizará por lo regular la expresión “un procedimiento de este tipo”, siempre que expresamente no se haga referencia a otro procedimiento. Formas “naturales” y “no naturales” de precursores de la carboxipeptidasa B son aquellas moléculas que se presentan en la naturaleza (“formas precursoras naturales”) o que proceden de estas formas precursoras naturales por sustitución, adición o
10 delección de aminoácidos (“forma precursora no natural”), pudiéndose transformar, sin embargo, las formas precursoras no naturales por medio de un tratamiento enzimático en carboxipeptidasa B pancreática, activa, o en isoformas o muteínas de ella.

Particularmente preferido es un procedimiento de este tipo, en el cual la forma precursora no natural tiene la estructura siguiente:



en donde

20 S es un péptido señal, el cual provoca la secreción de la proteína de fusión originada en la expresión a partir del correspondiente microorganismo;

As es un aminoácido arbitrario codificable genéticamente;

25 E es un enlazador peptídico constituido por una secuencia de reconocimiento de endopeptidasa;

CB es la secuencia de aminoácidos de la carboxipeptidasa B o de una isoforma o de una muteína de la carboxipeptidasa B; y

30 x es un número entero de 0 - 100.

Es además preferido un procedimiento de este tipo, en el cual a la forma precursora natural o no natural se anexiona una secuencia peptídica, la cual hace posible la purificación por cromatografía de afinidad de la forma precursora, particularmente preferido es un procedimiento de este tipo, en el cual la secuencia anexionada para la purificación por cromatografía de afinidad representa 1 a 6, preferentemente 4 radicales de histidina.

Igualmente preferido es un procedimiento de este tipo, en el cual como microorganismo para la expresión se utiliza la levadura *Pichia pastoris*.

Es además preferido un procedimiento de este tipo, en el cual para el tratamiento enzimático se utilizan las enzimas tripsina, elastasa, factor Xa, quimotripsina o colagenasa, preferentemente tripsina.

Objeto de la invención es un procedimiento de este tipo en el cual la etapa (c) transcurre bajo condiciones de reacción adecuadas en presencia de una forma precursora de la insulina que contiene las cadenas B, C y A de la insulina o de un derivado de la insulina, formándose en este caso insulina madura o un derivado maduro de la insulina, que se aísla a partir de la mezcla de reacción.

Otro objeto de la invención es la utilización de procarboxipeptidasa B y carboxipeptidasa B en un procedimiento de este tipo.

Los presentes ejemplos deben ilustrar cómo se podría expresar y purificar procarboxipeptidasa B y (His)₄-procarboxipeptidasa B. Aparte de esto, se ilustra, cómo se podría activar procarboxipeptidasa B con tripsina, y por cierto tanto en forma aislada como también en el caso del empleo combinado de tripsina y procarboxipeptidasa B para la preparación de insulina.

Ejemplo 1

El ejemplo describe la preparación de una cepa recombinante de *P. pastoris* para la secreción de procarboxipeptidasa B humana. Como material de partida sirve un preparado de cDNA que se prepara conforme a métodos conocidos a partir de ARN, el cual fue aislada de tejido pancreático humano. Estos preparados de cADN se pueden obtener comercialmente por ejemplo de la razón social Clontech (nº de catálogo 7410-1). Para la amplificación de la secuencia diana de cADN, deseada, se sintetizan dos cebadores (primer). Las secuencias para ello se toman del banco de datos del Banco de Genes. Allí, la secuencia de cADN para la carboxipeptidasa B pancreática humana se puede obtener bajo el “Accession Nummer” (número de acceso) M81057. La secuencia del cebador P-CPBf22 orientado hacia delante
65 corresponde a la zona 22 bp - 32 bp y la secuencia del cebador P-CPBrev1271 orientado hacia atrás, a la región 1271 bp - 1250 bp. Para la amplificación se lleva a cabo una reacción en cadena con polimerasa estándar (PCR). Los productos de reacción de la PCR se separan por electroforesis en gel y la banda de ADN formada con la longitud esperada de

ES 2 270 827 T3

aproximadamente 1250 bp, se eluye y se hace reaccionar, en una reacción de ligamiento, con el vector PCR® del “TA Cloning®-Kits” original de la razón social Invitrogen. Células competentes de la cepa *E.coli* INV α F suministradas conjuntamente como componente del Kit se transforman con la mezcla de ligamiento, se extienden sobre placas de NA, que contienen 25 mg/litro de ampicilina, y se incuban a 37°C. A la mañana siguiente, a partir de las colonias desarrolladas se toman células, se vuelven a suspender en 20 μ l de agua estéril y se incuban durante 10 minutos a 94°C. A continuación se añade a la suspensión tampón de reacción PCR, el cual contiene respectivamente 0,2 μ g de los dos cebadores P-CPBf22 y P-CPBrev1271 descritos, de manera que se pueda llevar a cabo una PCR estándar en un volumen de reacción de 100 μ l. Los productos de la reacción se analizan a continuación por electroforesis en gel. Los transformandos que contienen ADN, los cuales se pueden amplificar a un fragmento de aproximadamente 1250 bp, se reconocen como verdaderos. De uno de los clones, así definidos, se aísla el plásmido de ADN y la secuencia de cADN insertada se caracteriza completamente mediante análisis secuencial. Se puso de manifiesto que la secuencia determinada es totalmente idéntica a la secuencia publicada por Aloy *et al.* (Biol. Chem., 379:149 - 155, 1998). De forma correspondiente a la publicación, para la expresión sirven los codones, que codifican los aminoácidos 95 a 307 de la procarboxipeptidasa. Como vector de expresión sirve el plásmido pPIC9, que fue descrito por Cregg, J.M. *et al.* (Bio/Technologie, 11:905-910, 1993) y Scorer, C.A. *et al.* (Bio/Technologie, 12:181 -184, 1994). El plásmido pPIC9 se abre para ello con las enzimas de restricción XhoI y EcoRI. Para la inserción de la secuencia del cADN en el vector se sintetizan dos cebadores. El cebador PPICCPBf orientado hacia delante tiene la secuencia

20 **XhoI** **Procarboxipeptidase →**
5' TTTTCTCGAGAAAAGACATCATGGTGGTGAGCAC 3' (SEQ ID NO.: 1)

25 y el cebador PPICCPBrev orientado hacia atrás, la secuencia

30 **EcoRI** **Procarboxipeptidase**
5' TTTTGAATTCCTTACTACTAGTACAGGTGTTCCAGGAC 3'
(SEQ ID NO.: 2)

35 En una reacción estándar PCR se amplifica el cADN con los dos cebadores y, después de su purificación, el fragmento originado se digiere con las enzimas XhoI y EcoRI. El fragmento confeccionado así a la medida se separa de la mezcla de reacción por precipitación, se recoge en agua y se hace reaccionar con el fragmento del vector, abierto, en una reacción de ligamiento. Células competentes de INV α F se transforman con la mezcla de ligamiento y se extienden sobre placas para la selección. Las colonias que contienen el plásmido de expresión deseado, se identifican mediante tecnología PCR, tal como se ha descrito. A partir de un clon reconocido como verdadero, se obtiene plásmido de ADN. Este ADN se introduce tal como lo describe Cregg J.M. *et al.* en la cepa auxótrofa para histidina *P. pastoris* GS115 (Scorer C.A. *et al.* Biotechnology, 12:181-184, 1994). Las colonias que después de su transformación se hicieron protótrofas para histidina, se examinaron en cuanto a la expresión de la proteína procarboxipeptidasa. Para ello se expresan 50 clones tal como lo describe Clare, J. J. *et al.* (Gene, 105:205 - 212, 1991). Al final de la expresión se toma 1 ml de medio de cultivo, las células se separan por centrifugación y el material transparente, sobrenadante, se liofiliza. Partes alíquotas del sobrenadante se analizan mediante electroforesis en gel de SDS - poliacrilamida. Después de la tinción con azul de Coomassie se aprecia que en el caso de muestras de algunos de los sobrenadantes, en la zona de 45000 dt de peso molecular, es claramente visible una banda, la cual no se observa en el caso de muestras de sobrenadantes de cultivos no inducidos. Esta banda es reconocida claramente en el análisis Western Blot por el anticuerpo anti-carboxipeptidasa B de cerdo de la razón social Chemicon (nº de pedido AB1801). A partir del clon que en este experimento da lugar al mejor rendimiento, se cultiva en un matraz de 2 litros un cultivo de 100 ml, se exprime la procarboxipeptidasa B y se aísla conforme al Ejemplo 2.

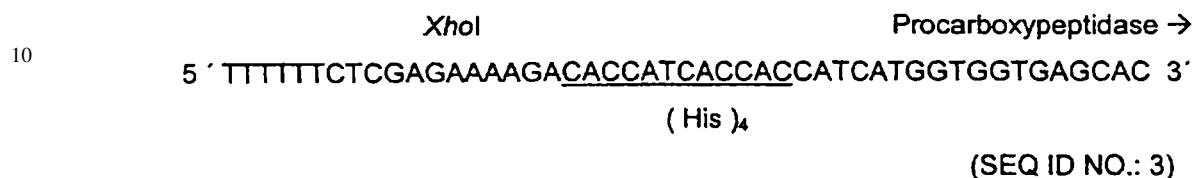
Ejemplo 2

55 El ejemplo describe la purificación de procarboxipeptidasa B humana a partir de materiales sobrenadantes de caldos de cultivo según el Ejemplo 1. Primeramente, las células se separan por centrifugación. El sobrenadante transparente se mezcla a continuación con sulfato de amonio hasta que se alcanza una saturación de aproximadamente 55%. La proteína precipitada se separa por centrifugación y el gránulo (pellet) se disuelve en 5 ml de una solución 50 mM de Tris - HCl (pH 7,5) que contiene 1 mM de EDTA. La suspensión proteica se separa a continuación por cromatografía sobre DEAE - celulosa. El cromatograma de elución se establece a lo largo de un gradiente 0 a 0,5 M de NaCl. Las fracciones que contienen la proteína deseada se identifican por análisis Western-Blot. Las fracciones se reúnen y se concentran por ultrafiltración. En el material retenido se determina la concentración de proteína mediante la determinación de proteínas según Bradford. La procarboxipeptidasa, así enriquecida, se liofiliza a continuación para su almacenamiento o se activa directamente según el Ejemplo 4 por activación con tripsina. La tinción con azul de Coomassie del material separado por electroforesis en gel muestra, que aproximadamente el 60% del material se encuentra en una banda de proteína de aproximadamente 45000 dt de peso molecular. La banda corresponde con la zona identificada con el Western Blot.

ES 2 270 827 T3

Ejemplo 3

El ejemplo describe la preparación del vector de expresión para la síntesis de (His)₄ - procarboxipeptidasa B. La construcción tiene lugar de forma correspondiente a la vía descrita en el Ejemplo 1. Se utiliza el cebador PPICCP-Brev (véase Ejemplo 1). El cebador orientado hacia delante se modifica de tal modo, que contiene cuatro codones adicionales para histidina. La secuencia del cebador PCPBHisf es correspondientemente:



La cepa de *P. pastoris*, así construida, se utiliza para la expresión y la proteína His - procarboxipeptidasa B, después de su precipitación con sulfato de amonio se purifica directamente en solución a través de una etapa de cromatografía de afinidad con níquel. Como material de soporte para la cromatografía se utiliza "ProBond™ NICKEL Chelating Resin" (Invitrogen n° de catálogo R801-01) de forma correspondiente a las instrucciones del fabricante. El análisis por electroforesis en gel, después de la tinción con azul de Coomassie, sólo proporciona prácticamente una banda visible, la cual presenta un peso molecular de aproximadamente 45000 dt. Esta banda es reconocida en el experimento Western Blot por el anticuerpo empleado. El material, así purificado, se ultrafiltra y después de la determinación de proteína según el método de Bradford o bien se liofiliza para su almacenamiento o bien se activa directamente conforme al Ejemplo 4.

Ejemplo 4

El ejemplo describe la activación de procarboxipeptidasa B por reacción con tripsina. Para ello, 22 mg del material liofilizado del Ejemplo 2 se disuelven en 14 ml de una solución 0,1 molar de Tris-HCl (pH 7,8), se calienta a 26°C y se mezcla con 15 µl de una solución de tripsina (0,1 U/ml) y se incuba durante 3 horas bajo agitación. A continuación, la solución se mezcla con un inhibidor de tripsina procedente de la baya de soja, y la tripsina, el inhibidor, los fragmentos del propéptido separados de la carboxipeptidasa B y otros componentes se separan de la carboxipeptidasa B por microfiltración a través de un elemento de filtración Centriprep® (razón social Amicon) con un límite de exclusión de pesos moleculares de 30000 dt. La carboxipeptidasa B activa se guarda liofilizada en un tampón 5 mM de Tris (pH 7,5). La determinación de la actividad específica tiene lugar después de la determinación de la concentración, de proteína de forma correspondiente a la prescripción de Folk, J.E. (Meth. Enzym., 19:504-508, 1970). Si se parte de material que fue preparado conforme al Ejemplo 3, entonces para la activación sólo se utilizan 15 mg del material de partida.

Ejemplo 5

El ejemplo describe el empleo combinado de tripsina y procarboxipeptidasa B para la preparación de insulina a partir de mono-Arg-insulina. El ejemplo 6 de la solicitud de patente europea EP-A 0 347 781 describe la reacción de mono-Arg-insulina con tripsina y carboxipeptidasa B en un mismo recipiente de reacción. En el presente ejemplo se reemplaza, ahora, la carboxipeptidasa B en el ejemplo 6 de la solicitud de patente europea EP-A 0 347 781 por 15 µg de procarboxipeptidasa B del Ejemplo 2 de esta solicitud o, respectivamente, por 10 µg de procarboxipeptidasa B del Ejemplo 3 de esta solicitud. En las dos reacciones se incrementa la concentración de tripsina empleando 3 µl de tripsina en lugar de 2,5 µl de la solución patrón (conforme al Ejemplo 6 de la solicitud de patente europea EP-A 0 347 781).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de insulina madura o de un derivado maduro de insulina, de modo que

- 5 (a) una forma precursora natural o no natural de carboxipeptidasa B o de una isoforma o una muteína de la carboxipeptidasa B se exprime de forma secretora en un microorganismo,
- (b) la forma precursora expresada de manera secretora se purifica, y
- 10 (c) la forma precursora purificada se transforma por medio de un tratamiento enzimático en la carboxipeptidasa B activa o en la isoforma o en la muteína de la carboxipeptidasa B;

15 en donde la etapa (c) transcurre bajo condiciones de reacción adecuadas en presencia de una forma precursora de la insulina que contiene las cadenas B, C y A de la insulina o de un derivado de la insulina, formándose en este caso insulina madura o un derivado maduro de la insulina, que se aísla a partir de la mezcla de reacción.

2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1, en el cual la carboxipeptidasa B pancreática o una isoforma de ésta procede del ser humano.

20 3. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 o 2, en el cual la forma precursora corresponde a la procarboxipeptidasa B o a una isoforma de la procarboxipeptidasa B.

25 4. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 o 2, en el cual la forma precursora no natural de la carboxipeptidasa B tiene la siguiente estructura:



30 en donde

S es un péptido señal, el cual provoca la secreción de la proteína de fusión originada en la expresión a partir del correspondiente microorganismo;

35 As es un aminoácido arbitrario codificable genéticamente;

E es un enlazador peptídico constituido por una secuencia de reconocimiento de endopeptidasa;

40 CB es la secuencia de aminoácidos de la carboxipeptidasa B o de una isoforma o de una muteína de la carboxipeptidasa B; y

x es un número entero de 0 - 100.

45 5. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual a la forma precursora natural o no natural se ha anexionado una secuencia peptídica, la cual hace posible la purificación por cromatografía de afinidad de la forma precursora.

6. Procedimiento conforme a la reivindicación 5, en el cual la secuencia anexionada para la purificación por cromatografía de afinidad representa 1 a 6, preferentemente 4 radicales de histidina.

50 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual como microorganismo para la expresión se utiliza la levadura *Pichia pastoris*.

55 8. Procedimiento conforme a una de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual para el tratamiento enzimático se utilizan las enzimas tripsina, elastasa, factor Xa, quimotripsina o colagenasa, preferentemente tripsina.

60

65